Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba, Basel

Vorkommen, Natur und Bedeutung von Sulfonamid-Antagonisten (Inhibitoren) in Körpermedien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von
MARTIN ALLGÖWER
von St. Gallen

1944

Druck von Benno Schwabe & Co. Basel

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546712_0126

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba, Basel

Vorkommen, Natur und Bedeutung von Sulfonamid-Antagonisten (Inhibitoren) in Körpermedien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von
MARTIN ALLGÖWER
von St. Gallen

1944

Druck von Benno Schwabe & Co. Basel

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf
Antrag von Professor Dr. Rolf Meier

Tag der Promotion: 17. Mai 1944

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus den «Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta»
Vol. 2, Fasc. 4 (1944)

Aus experimentellen Befunden ist eine ganze Reihe von Stoffen bekannt geworden, die die parasitotrope Wirkung der Sulfonamide wettzumachen vermögen: Antagonisten, Inhibitoren.

Die bis jetzt bekannten Antagonisten sind, soweit die Literatur zugänglich war, in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

a) *Chemisch definierte Antagonisten:*

p-Aminobenzoesäure (40)
Na-Salz der p-Aminobenzoesäure (30)
Ester der p-Aminobenzoesäure: Novocain, Tutocain, Pantocain usw. (17, 31)
p-Aminobenzoyl-1-glutaminsäure (1)
p-Aminobenzamidopyridid (17)
p-Aminobenzamidoäthylthiodiazol (17)
Nikotinsäureamid, Cozymase (38)
Methionin (11)
Methionin + Xanthin (12)
Methionin + Guanin (12)
Adenin-6-aminopurin (22)
Urethan (16)
Xylose (14)
Maltose (32)

b) *Chemisch nicht definierte Antagonisten:*

Stoffe aus:
Geweben (26)
Harn (26)
Blut (35)
Plasma (35)
Eiter (28)
Pepton (28)
Pflanzen (13)
Bakterien (13)
Bakterien nach Behandlung mit p-Nitrobenzoesäure (30)
Hefe — Aetherlösliche Stoffe (p-Aminobenzoesäure!)
— Acetonlösliche Stoffe } (20)
— Acetonunlösliche Stoffe

Herrn Dr. Dr. h. c. *Max Hartmann* zum 60. Geburtstage.

c) *Die Sulfonamidwirkung setzen ferner herab:*
Tiefe Temperatur (39)
Niedrige pH-Werte (7)

Die Verdrängungstheorie

Der von *Woods* (40) gefundene antagonistische Effekt der p-Aminobenzoesäure gab diesem Autor Anlaß, auf die chemische Verwandtschaft des Grundkörpers der Sulfonamide – der p-Aminobenzolsulfosäure – mit der p-Aminobenzoesäure hinzuweisen, und, unter der zwar unerwiesenen Voraussetzung der für die Bakterien lebensnotwendigen Funktion der p-Aminobenzoesäure, auf eine Verdrängung dieses hypothetischen Bakterienmetaboliten durch die Sulfonamide zu schließen. *Fildes* (5) faßte diese Theorie allgemein so: Die Bakterienvermehrung kann verhindert werden durch «Interferenz» mit einem für die Plasmasynthese wichtigen Faktor (essentiellen Metaboliten). Dabei sind essentielle Metaboliten, die von einem bestimmten Bakterium nicht selbst gebildet werden können, für dieses Bakterium als Wuchsstoff zu bezeichnen (growth factor).

Es gibt nun, um *Fildes* zu folgen, 3 Möglichkeiten der «Interferenz» mit essentiellen Metaboliten:

1. Oxydation eines Metaboliten, der ein bestimmtes Redoxpotential verlangt (Hemmung von Anaerobiern durch Sauerstoff).

2. Fixierung eines essentiellen Metaboliten in einer molekularen Verbindung (SH-Gruppe durch Quecksilberazetat).

3. Verdrängung eines essentiellen Metaboliten von einer Enzymoberfläche.

In diesem 3. Mechanismus ist nach *Fildes* das Wesen der Sulfonamidwirkung zu sehen. Der p-Aminobenzoesäure (wie übrigens auch der Nikotinsäure und der Pantothensäure) wird Cofermentcharakter zugeschrieben. Sie würde sich mit einem (oder mehreren) eiweißartigen Apoferment zu einem (oder mehreren) für die Zellvermehrung wesentlichen Holoferment zusammensetzen. Diese Fermentbildung würde nun durch das Dazwischentreten der chemisch ähnlich strukturierten Sulfonamide blockiert. Damit wird die Verdrängungstheorie zu einem Spezialfall der von *Mellon* (29) begründeten allgemeineren Fermenthemmungstheorie.

Nach *Harris* und *Kohn* (10, 11) ist die Verdrängungstheorie etwas allgemeiner zu fassen. Die Sulfonamide würden die Synthese gewisser Stoffe verunmöglichen, die in einer ersten Stufe (Primärreaktionen) durch katalytisch gedachten Einfluß der p-Aminobenzoesäure entstünden. Diese Stoffe ließen dann über den Weg von Sekundärreaktionen erst die eigentlichen Wuchsstoffe entstehen. Die Primärreaktionen würden nicht alle bei der gleichen Sulfonamidkonzentration aufgehoben, sondern eine wachsende Sulfonamidkonzentration soll eine wachsende Zahl von Synthesen verunmöglichen. Wenn also beispielsweise bei niedriger Sulfonamidkonzentration Methionin noch voll kompensieren kann, genügt es bei hoher Dosierung auch in großer

Menge zugegeben nicht mehr, weil nun noch andere wesentliche Stoffe nicht mehr synthetisiert werden können.

In allgemeiner Formulierung kann gesagt werden, daß alle Modifikationen der Verdrängungstheorie der Tatsache gerecht zu werden suchen, daß es bakterienwachstumshemmende und als ausgesprochene Gegenspieler auftretende Substanzen gibt, die zumeist als wachstumsfördernde Faktoren erst dadurch bemerkbar werden, daß sie den Hemmstoff in seiner Wirkung aufheben, während sie im normalen Nährmedium oder im nährstoffarmen Medium keinen zusätzlichen Wachstumseffekt hervorzubringen brauchen.

Es handelt sich hier um ein Phänomen, das nicht auf die Gruppe der Sulfonamide und ihre Antagonisten beschränkt ist, sondern eine allgemeine Erscheinung darstellt. Es seien in Tabelle 2 ohne Anspruch auf Vollständigkeit zwei Gruppen von Antagonisten zusammengestellt. Die erste Gruppe umfaßt bakterienhemmende und bakterienfördernde Stoffpaare mit naher chemischer Verwandtschaft. In der zweiten Gruppe sind solche Antagonistenpaare aufgeführt, die formelmäßig nur eine entfernte oder gar keine chemische Verwandtschaft erkennen lassen.

Die Wirkung des Marfanils, p-(aminomethyl)benzolsulfonamid, wird durch die entsprechende p-(aminomethyl)benzoesäure nicht aufgehoben (15). Das

Tabelle 2

a) *Antagonisten mit naher chemischer Verwandtschaft:*

Wuchsstoff	*Hemmstoff*	
p-Aminobenzoesäure	p-Aminobenzolsulfosäure und Gruppe der Sulfonamide	(40)
p-Aminobenzoesäure	p-Aminophenylketone	(2)
Nikotinsäure	Pyridin-3-Sulfonamid	(36)
Pantothensäure	Sulfopantothensäure	(36)
Pantothensäure	Pantoyltaurin Pantoyltauramid	(25)
Methionin	Homologe Aminosäuren (Aminobuttersäure, Norvalin, Norleucin)	(11)
Tryptophan	Indolyl-Acrylsäure	(5a)
Tryptophan	β-[Naphtyl-(1)] Acrylsäure	(2a)

b) *Antagonisten mit geringer oder keiner chemischen Verwandtschaft:*

Wuchsstoff	*Hemmstoff*	
Methionin	Sulfonamide	(11)
Xylose	Sulfonamide	(14)
Maltose	Sulfonamide	(32)
Urethan	Sulfonamide	(16)
Nikotinsäure Cozymase	Sulfonamide	(38)
Methionin p-Aminobenzoesäure	Hypoxanthin Guanin (In Stämmen mit angezüchteter Sulfonamidresistenz)	(12)
Pantothensäure	Salicylat-Ion	(16a)

$\alpha\,\gamma$ Oxy $\beta\,\beta$ dimethylbuttersäurelacton

Thiazol-5-carbonsäureamid kann gegenüber Pyridin-3-sulfonsäure bei Proteus vulgaris als wachstumsfördernder Faktor auftreten, während es bei Staphylokokken den wachstumsfördernden Effekt von Nikotinsäureamid schwach hemmt (36).

Diese Beispiele veranschaulichten deutlich die Unmöglichkeit, Wuchsstoff- und Hemmstoffwirkung auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen. Die Formulierung der Verdrängungstheorie der Sulfonamidwirkung, daß die Aminocarbonsäuren durch die entsprechenden Aminosulfonsäuren verdrängt werden, erweist sich als zu eng. Auch die von *Wagner-Jauregg* vertretene Ansicht, daß im Wuchsstoff die basische NH_2-Gruppe und die saure Carboxylgruppe, im Hemmstoff dagegen mindestens eine dieser Gruppen vertreten sein müsse, trifft für verschiedene der angeführten Sulfonamidantagonisten nicht zu.

Ein von *Wallersteiner* (37) mitgeteilter Befund dürfte ebenfalls schwer mit der Verdrängung chemisch ähnlicher Partner allein zu erklären sein. Dieser Autor stellte fest, daß Kombinationen von Sulfonamid und Harnstoff bei Gegenwart von p-Aminobenzoesäure in Konzentrationen bakteriostatisch zu wirken vermögen, in denen keiner dieser Körper allein eine Wirkung hervorzubringen vermag.

Die Tatsache, daß antagonistische Beeinflussung bakteriotroper Wirkungen vorkommt, ist über jeden Zweifel erhaben. Ob es sich dabei aber in jedem Falle um einen Verdrängungsmechanismus auf Grund einfacher chemischer Verwandtschaftserscheinungen handelt, ist nicht erwiesen.

Die Sulfonamid-Inhibitoren in Organpreßsäften und im Blutserum

Angaben der Literatur

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über Inhibitoren in Organextrakten. *McLoed* (26) fand Antagonisten in Extrakten aus frischen Muskeln, Pankreas, Milz, nicht aber in Leberextrakten. Autolyse und Säurehydrolyse steigern den Antagonisteneffekt. *Strauss* und *Finnland* (35) stellten ebenfalls Organbreie her, in denen sie Antagonisten feststellten. Sie verwendeten aber Zusätze von Pepton oder Caseinhydrolysaten. *McIlwain* (24) stellte in menschlichem Plasma Inhibitorstoffe fest und glaubt, sie an Hand von Bewachsungsresultaten mit Clostridium acetobutylicum als p-Aminobenzoesäure identifizieren zu können. Hydrolyse und Autolyse steigern angeblich den «p-Aminobenzoesäure»-Gehalt. Auch andere Autoren fanden, allerdings unter Zugabe von Pepton (*Rammelkamp* [33]) oder durch Hydrolyse (*King* [19]) Antagonisten in Organextrakten.

Eigene Untersuchungen

Durch die Angaben in der Literatur sowie nach eigenen Versuchen ist die Annahme von in vivo bedeutsamen Sulfonamidantagonisten gestattet. Dagegen liegen über ihre Bedeutung und über ihre chemische Natur in qualita-

tiver Hinsicht nur wenig schlüssige Befunde vor. Wegen der Bedeutung dieser Frage schien es notwendig, weitere Unterlagen zu sammeln.

Untersuchungen in drei Richtungen schienen hier Möglichkeiten zu bieten:

1. Trennung der Inhibitoren in kristalloide und nichtkristalloide Stoffe.

2. Nachweis oder Ausschluß der in vitro für den Wirkungsmechanismus der Sulfonamide hauptsächlich bedeutsamen p-Aminobenzoesäure in den wirksam gefundenen Fraktionen.

3. Weitere Charakterisierung der physikalisch-chemischen Natur der auffindbaren Antagonisten.

Methodik

Zur Abklärung der im tierischen Organismus möglichen Inhibitionswirkungen wurden die Inhibitoreigenschaften nativer Körpermedien, d. h. möglichst unveränderter *Organpreßsäfte*, untersucht. Dabei trachteten wir darnach, bei der Herstellung der Körpermedien autolytische Vorgänge möglichst zu vermeiden. Dazu verzichteten wir auf jegliche Zugabe von «körperfremden Inhibitoren».

Die Trennung der Körpermedien in eine kristalloide und eine kolloidale Fraktion erfolgte durch *Ultrafiltration*. Die Ultrafiltration wurde mit Kollodium-überzogenen Porzellankolben ausgeführt, die, unter Vakuum stehend, in der zu filtrierenden Flüssigkeit bewegt wurden. Das Ueberziehen der Kolben mit Kollodium erfolgte durch Eintauchen in 10%ige Eisessig-Kollodiumlösung nach *Bechhold-König* und Auswaschen. Jedes Filtrat wurde mit Sulfosalicylsäure unter Stehenlassen und leichtem Erwärmen auf Eiweißfreiheit geprüft.

Die *Sterilisation der Körpermedien* wurde mittelst Passieren durch Chamberland-Kerzen erreicht.

Für die einzelnen Medien wurde folgendermaßen vorgegangen:

Blutmedium.

Es wurde Serum von Mensch und Rind ultrafiltriert. Ultrafiltrat und Rückstand fanden inaktiviert Verwendung (1 Std. bei 60° C).

Lebermedium.

Drei Teile (1,8 kg) frische Kalbsleber fein zerhackt und ein Teil (600 ccm) Aq. dest. wurden in Kältemischung eingefroren, dann kurz aufgetaut und mit hydraulischer Presse bei 300 Atm. ausgepreßt. Der trübe Saft (1200 ccm) wurde zuerst zentrifugiert, dann durch verschiedene Asbestklärschichten auf Porzellannutschen geklärt bis zur vollständigen Durchsichtigkeit und hernach ultrafiltriert. Der an sich klare, sehr eiweißreiche Ultrafiltratrückstand zeigte sich sehr unbeständig. Schon bei Brutschranktemperatur fiel Eiweiß aus. Er mußte deshalb zur Ausschaltung dieser labilen Kolloide inaktiviert werden. Die zeitraubende, zur möglichsten Schonung angewandte Methode der Klärung durch Asbestschichten erwies sich somit als ungeeignet. Deshalb wurden die anderen Organbreifiltrate inaktiviert und das ausfallende Eiweiß abzentrifugiert.

Kalbsmuskelmedium.

2,4 kg Kalbsmuskel + 800 ccm Aqua dest., 12 Stunden bei +1° im Kühlschrank, zufügen von 0,7 g NaCl, auspressen (1200 ccm Saft), inaktivieren (60°), abzentrifugieren, überstehende Flüssigkeit ultrafiltrieren.

Kaninchenmuskelmedium.

2 kg Muskel (frisch getötete Kaninchen) + 1000 ccm Aqua dest. 12 Stunden bei + 1° im Kühlschrank, zufügen von 0,8 g NaCl, auspressen (1300 ccm Saft), inaktivieren (60°), abzentrifugieren, ultrafiltrieren.

Anreicherung der Ultrafiltrate.

In Ultrafiltraten des Blutes sowie der Organflüssigkeiten findet nur unregelmäßiges Wachstum von E. coli statt. Nach Anreicherung mit einem inhibitorfreien Salz-Glykosegemisch (SG-Medium nach *Harris* und *Kohn*: 4 g NaCl, 0,2 g $MgSO_4$ 7 H_2O, 2 g KH_2PO_4, 2 g $(NH_4)_2HPO_4$, 2 g Glykose, 500 ccm Aqua dest. + 500 ccm Aqua fontis) tritt reichliches Wachstum auf.

Inhibitorarmes Medium.

Für die Abklärung der Inhibitorwirkung der nativen Medien war der Vergleich mit einem möglichst inhibitorarmen Medium notwendig. Dazu wäre an sich das beschriebene Salz-Glykosemedium nach *Harris* und *Kohn* am geeignetsten. Es fand in einigen Versuchen Verwendung. Bei Versuchen mit 100 und mehr Röhrchen ergab dieses Medium mit älteren Colistämmen jedoch oft verschieden schnelles Wachstum in den einzelnen Röhrchen, während das terminale Wachstum, allerdings oft erst nach einigen Tagen ablesbar, regelmäßig war. Es wurde deshalb das Salzglykosemedium durch Zugaben folgender Aminosäuren sowie Abkochung roher Watte angereichert.

SGAW-Medium.	dl-Leucin	250 mg
	dl-Phenylalanin	125 mg
	dl-Asparaginsäure	250 mg
	Watteabkochung	30 ccm
	Salzglykosemedium ad	1000

Dieses Medium ergab bei guter Cibazolempfindlichkeit schnelles und reichliches Wachstum für E. coli.

Es wurde auch noch ein von *Harris* und *Kohn* angegebenes halbsynthetisches PPFG-Medium verwendet.

Pepton	20,0
NaCl	6,0
Glucose	2,0
Fumarsäure	0,4
Aqua dest. ad	1000

Auf p_H 7,8 bringen mit NaOH, autoklavieren.

Verwendetes Sulfonamid, dessen Zugaben zu den Medien sowie die Zugabe der verschiedenen p-Aminobenzoesäure-Konzentrationen.

Da die vergleichsweise Verwendung mehrerer Sulfonamide die Versuche zu sehr kompliziert hätte, wurde nur ein Vertreter dieser Stoffklasse, das 2-Sulfanilamidothiazol, Cibazol, verwendet.

Die Medien wurden im allgemeinen folgendermaßen zusammengestellt:

5 Teile SGAW-Medium + doppelte gewünschte Sulfathiazolkonzentration,

3 Teile Organflüssigkeit,

1 Teil p-Aminobenzoesäure in SGAW-Medium.

Dies wurde zur Kontrolle der Sterilität ca. 20 Stunden im Brutschrank gehalten und hernach

1 Teil Inoculat in SGAW-Medium zugefügt.

Verwendete Bakterien.

Als Bakterien für die Versuche wurden E. coli verwendet. Es veranlaßten uns dazu folgende Gründe:

Sie sind in vitro gut beeinflußbar durch Sulfonamide. Sie lassen sich morphologisch leicht beurteilen. Sie erlauben Auszählung in der Zählkammer und sind als anspruchslose Keime geeignet zur Züchtung in synthetischen Medien. Die verwen-

deten Kolistämme wurden in Bouillon- und Agarpassagen gezüchtet. Da die Koli spontane Resistenzänderungen gegen Cibazol zeigten, konnte nicht immer der gleiche Stamm verwendet werden. Es wurden jeweils durch Vorversuche die sulfonamidempfindlichsten Keime ermittelt.

Wachstumsmessung.

a) Auszählung in der Zählkammer (Thoma-Zeiß).

Bei einiger Uebung ließen sich mit dieser Methode befriedigende Resultate erzielen bei Beobachtung im Binocular mit maximal lichtempfindlichem Auge in der Dunkelkammer.

Es werden Verdünnungen mit Ringerformol in die Zählkammer verbracht. Nach einiger Zeit finden sich fast sämtliche Koli auf den Zählkammerboden abgesunken. Trotzdem wird über jedem Quadrat langsam hochgedreht, bis Einzelheiten des Deckglases scharf erscheinen. Auf diese Weise werden auch die sich in Suspension befindlichen Keime mitgezählt.

b) Trübungsmessung.

Es wurde hier eine einfache Methode gewählt, die jedoch für unsere Zwecke genügende Resultate ergab. Es wurden gut bewachsene Röhrchen zusammengegossen und hierauf z. B. 1 Teil bewachsenes Medium + 5 Teile Ringerformol oder 2 Teile mit 4 Teilen Ringerformol usw. versetzt und so verschiedene Trübungsgrade erhalten. Die Beurteilung des Wachstums erfolgte durch Vergleich mit diesen Kontrollen im indirekten Licht. Waren gefärbte Körpermedien zu beurteilen, so wurde ein gelblicher Uranglasfilter bei der Beurteilung verwendet. Mit dieser Methode lassen sich brauchbare Vergleichsmessungen in verschiedenen Medien vornehmen, währenddem der zeitliche Ablauf der Vermehrung nur grob zum Ausdruck gebracht werden kann.

Inokulat.

Für Inokulate mit genau angegebenen Zahlen wurden zweimal gewaschene Kolisuspensionen in der Zählkammer gezählt und hernach aus der Suspension die gewollte Verdünnung in SG-Medium hergestellt und inokuliert. Bei den anderen Versuchen wurde meist mit einem ungefähren Inokulat von 100,000 Keimen pro ccm gearbeitet. Bouillon von 12–14 Stunden wurde zu 8mal 10^8 Keimen angenommen und unter Waschen und Verdünnen das gewollte Inokulat hergestellt.

Eigene Ergebnisse

Aus der Art der Versuchsanordnungen ergeben sich 2 Arten der bildlichen Darstellung der Resultate:

1. *Kurven:*

Sie stellen den zeitlichen Wachstumsablauf, ausgezählt in der Zählkammer, dar. Die Ordinate gibt den Log. der Bewachsungszahl (Log. N) und die Abszisse die Zeit wieder.

2. *Trübungsmessung:*

Die Trübung wird hier durch Flächen wiedergegeben, in % der maximalen Trübung des jeweiligen Versuches. Je nach Medium bedeutet der Wert «100%» einen verschiedenen Trübungswert, so daß die Vergleiche zwischen den einzelnen Versuchen nicht nach absoluten Zahlen, sondern nach dem Bewachsungstypus gemacht werden müssen. Der Unterschied zwischen den den verschiedenen Versuchen zugrunde liegenden Werten «100%» beträgt nicht mehr als 50%.

A. Die kristalloide und kolloide Natur der Inhibitionsfaktoren

Die Methode der Ultrafiltration diente zur Abklärung der Frage, ob die konstatierten Inhibitoren in Stoffe kristalloider und kolloider Natur zu trennen sind.

Abb. 1 vergleicht die Inhibitorwirkung des Ultrafiltrates und Filtratrückstandes aus *Kalbsmuskelsaft*, die einer Peptonbouillon sowie den von *Harris* und *Kohn* angegebenen SG- und PPFG-Medien gegenübergestellt werden. Ultrafiltratrückstand ist hier sehr reich an Antagonisten. Das Ultrafiltrat erscheint bedeutend ärmer an solchen Stoffen. Es ist aber, verglichen mit inhibitorfreiem Medium, noch stark wirksam. Dieser Befund ließ sich auch mit anderen Extrakten aus Kalbsmuskel bestätigen. Ein aus *Kaninchenmuskel* hergestellter Preßsaft ließ den in Abb. 2a wiedergegebenen deutlichen Unterschied zwischen Ultrafiltrat und Filtratrückstand feststellen. *Kalbslebersaft* ergab ebenfalls ein deutliches Ueberwiegen des Inhibitoreffektes im Ultrafiltratrückstand (Abb. 2b). Bei diesem Versuch ist gleichzeitig erwähnenswert, daß die Kolibazillen in dem unter Cibazolwirkung

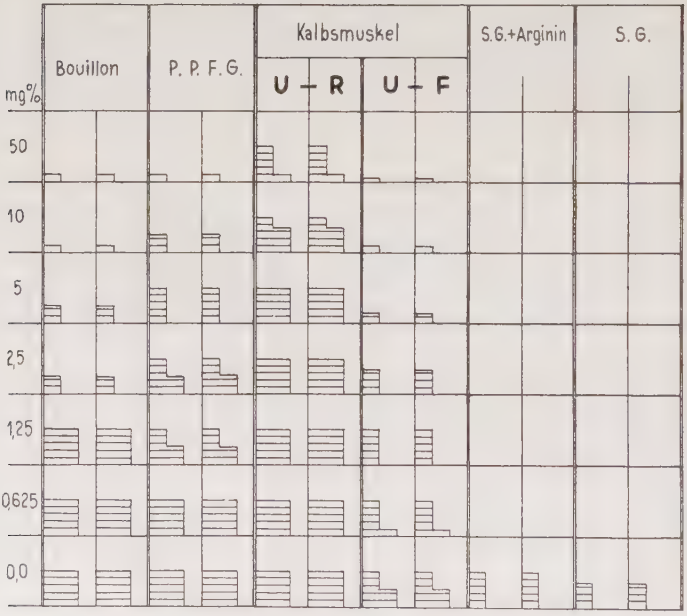
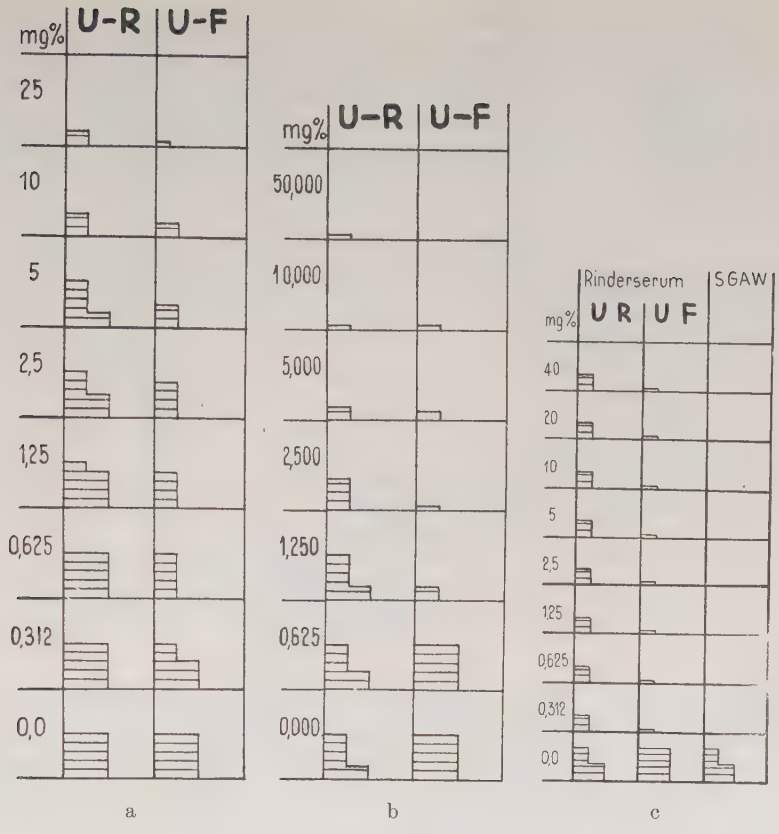


Abb. 1.

Ablesung nach 48 Std.
Inokulat: ca. 100,000 Keime / ccm.
Je zwei Röhrchen enthalten den gleichen Inhalt.
UR = Ultrafiltratrückstand
UF = Ultrafiltrat.



a b c

Abb. 2 a, b, c.
Ablesung nach 24 Std.
Inokulat: ca. 100,000 Keime / ccm.

stehenden Ultrafiltrat typische lange Degenerationsformen darbc ten, während dies im Rückstand nicht der Fall war. Auch die Gärung war im Ultrafiltrat deutlich stärker gehemmt als im Ultrafiltratrückstand. *Rinderserum* gibt, wie beispielsweise Abb. 2c zeigt, im Ultrafiltratrückstand schlechteres Wachstum als im Ultrafiltrat. Trotzdem ist im Ultrafiltrat die Inhibitorwirkung sehr gering, so daß im Serum sehr wenig kristalloide Inhibitoren anzunehmen sind. In *Menschenserum* ließen sich die gleichen Verhältnisse nachweisen. Es wurden hier kleinere Versuchsreihen angesetzt, dafür aber das Wachstum in seinem zeitlichen Ablauf genau verfolgt. Dabei erhielten wir das in Abb. 3 wiedergegebene Resultat.

Nach diesen Versuchen kann kein Zweifel bestehen, daß sowohl kristalloide ultrafiltrierbare als auch kolloide „Inhibitoren" vorhanden sind. Die Wirksamkeit der kolloiden Faktoren ergibt sich aus der Tatsache, daß der Ultrafiltrat-

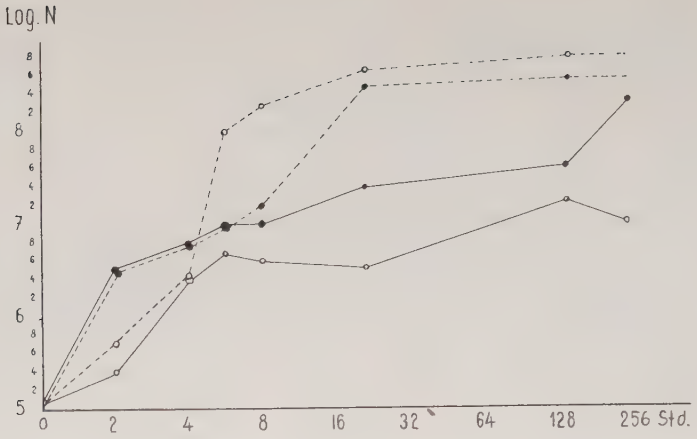


Abb. 3.

Zählkammerresultat:
Inokulat 100,000 Keime / ccm
●– – –● Kontrolle Ultrarückstand
●——● 5 mg% Ultrarückstand
○– – –○ Kontrolle Ultrafiltrat
○——○ 5 mg% Ultrafiltrat

rückstand in allen Versuchen einen größeren Inhibitoreffekt auszuüben imstande ist als das Ultrafiltrat. Der Ultrafiltratrückstand enthält also neben den natürlich auch vorhandenen kristalloiden Faktoren zusätzliche «kolloide» Antagonisten.

Es besteht die Möglichkeit, daß die Unterschiede der verschiedenen Organmedien und ihrer Fraktionen verursacht sind:

a) durch quantitativ verschiedenen Gehalt eines Inhibitors;
b) durch Vorkommen des gleichen Inhibitors in verschiedener Form;
c) durch verschiedene «Inhibitoren».

Der Angriff der Sulfonamide über die p-Aminobenzoesäureverdrängung ist momentan die hauptsächlichste Wirkungshypothese. Es ist schwierig und nicht beabsichtigt, die Bedeutung der p-Aminobenzoesäure abzuklären, insoweit sie im Bakterienstoffwechsel als essentieller Metabolit gebildet wird. Hingegen ist die Frage, ob die im Körper vorhandenen Antagonisten hauptsächlich oder wesentlich durch ihren Gehalt an p-Aminobenzoesäure wirksam sind, prüfbar.

Chemischer und biologischer Nachweis der p-Aminobenzoesäure in Körpermedien.

Nachweis oder Ausschluß von wirksamen p-Aminobenzoesäurekonzentrationen in Körpermedien wird dadurch erschwert, daß die Grenze der bio-

logischen Wirksamkeit in vitro unter der Grenze der chemischen Nachweisbarkeit liegt, die für das übliche Diazotierungsverfahren etwa bei 10^{-6} Mol liegt (Nachweis mit Methode nach *Druey-Oesterheld*), bei Medien mit starker Eigenfarbe allerdings auch etwas höher sein kann. Die Grenze der biologischen Wirksamkeit, d. h. des Inhibitoreffektes, befindet sich für E. coli bei 10^{-7} Mol, wie aus Versuchen von *Hirsch* (13) und aus eigenen Resultaten hervorgeht.

Wenn also *McIlwain* (24) im menschlichen Plasma auf Grund von Bewachsungsresultaten mit dem p-Aminobenzoesäure verlangenden Clostridium acetobutylicum auf eine p-Aminobenzoesäurekonzentration von 10^{-8} Mol und weniger schließt, so ist mit Sicherheit zu sagen, daß diese Konzentrationen für E. coli keine Wirksamkeit mehr besitzen. Trotzdem vorhandene Inhibition müßte also auf andere Stoffe zurückgeführt werden.

Man ist so zur Verwendung des biologischen Nachweises gezwungen.

Spielt p-Aminobenzoesäure unter den körpereigenen Inhibitoren eine entscheidende Rolle, so muß sie sehr wahrscheinlich als leichtlöslicher Körper in gleicher Konzentration, d. h. in gleicher biologischer Wirkungsstärke, im Ultrafiltrat wie im Ultrafiltratrückstand vorhanden sein. *Der in den erwähnten Versuchen gefundene Unterschied zwischen Ultrafiltrat und Ultrafiltratrückstand läßt sich mit einer alleinigen Bedeutung der gelösten p-Aminobenzoesäure in freier Form nicht vereinen.*

Dagegen sind allerdings Einwände zu machen.

Es könnte sein, daß einerseits durch die bekannte Adsorption der Sulfonamide an die Eiweißfraktion (*Schönholzer*) eine Wirkungsverminderung des Sulfathiazols in der kolloiden Fraktion einträte, oder daß anderseits p-Aminobenzoesäure, als chemisch ähnlicher Körper ebenfalls an die Eiweißfraktion adsorbiert, im Ultrafiltratrückstand zurückgehalten würde. Die Behandlung dieser Einwände erfolgt zum Teil in dem Abschnitt über die physikalisch-chemischen Untersuchungen.

Ein weiterer Einwand gilt der Methode der Ultrafiltration. Wir haben die Adsorption von p-Aminobenzoesäure an die Filtermasse untersucht. Dabei stellten wir fest, daß die Ultrafilter den Gehalt des Ultrafiltrates an p-Aminobenzoesäure in geringem Maße herabzusetzen vermögen. Die minime Menge dieses Stoffes, die tatsächlich im Ultrafilter zurückgehalten werden könnte, vermag aber die gefundenen Unterschiede kaum zu erklären, um so weniger, als bei der Herstellung der Körpermedien relativ große Mengen ultrafiltriert worden sind.

Um die Frage abzuklären, ob methodisch oder sonst bedingte rein quantitative Unterschiede im p-Aminobenzoesäuregehalt wesentlich den Unterschied der Medien und ihrer Fraktionen verursachen können, ist es gegeben, der inhibitorärmeren Fraktion p-Aminobenzoesäure in verschiedenen Mengen zuzugeben. Weichen die Bewachsungstypen dann immer noch stark voneinander ab, so läßt das wiederum an überwiegend qualitative Verschiedenheiten der Inhibitoren denken.

Bei Zugabe von p-Aminobenzoesäure zu Leberultrafiltrat ergibt der Vergleich mit dem unveränderten Ultrafiltratrückstand das in Abb. 4 wiedergegebene Resultat. Der Bewachsungstypus des Ultrafiltrates verliert hier

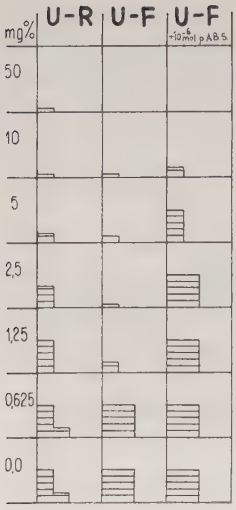


Abb. 4.
Ablesung nach 24 Std.
Inokulat
100,000 Keime / ccm.

durch p-Aminobenzoesäurezugabe nichts von seiner Sprunghaftigkeit. Er zeigt eine sehr starke Inhibition in den niederen Sulfathiazolkonzentrationen mit plötzlichem Abfall bei steigender Dosierung. Es erfolgt hier keineswegs eine Angleichung des Wachstumstypus von Ultrafiltrat und Rückstand, obwohl p-Aminobenzoesäure in nahezu maximal inhibierender Dosierung zugegeben wurde. Die Zugabe von p-Aminobenzoesäure zu Kaninchenmuskelultrafiltrat ergab die Bestätigung dieses Resultates.

Eine andere Versuchsreihe zur Abklärung der hypothetischen Rolle der p-Aminobenzoesäure ist dadurch gegeben, daß man zu fortschreitenden Verdünnungen der Körpermedien mit inhibitorfreier Nährlösung (SGAW-Medium) p-Aminobenzoesäure in verschiedenen Konzentrationen zugibt. Ist nun p-Aminobenzoesäure der hauptsächliche Antagonist, der verdünnt wird, so muß dessen Zugabe wieder den Bewachsungstyp der unverdünnten Körpermedien entstehen lassen, und zwar in Konzentrationen, die nicht höher sind, als sie in der Ausgangslösung nachgewiesen werden können. Es wurde dabei nur soweit verdünnt, als in den sulfonamid-

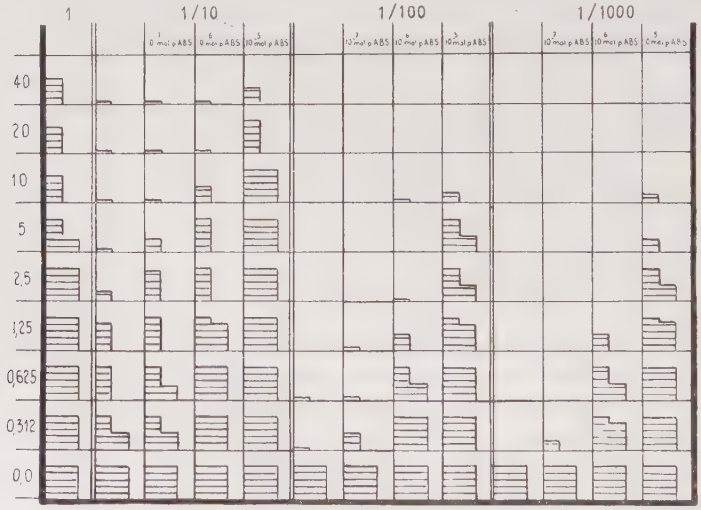


Abb. 5.
1 $^1/_{10}$ $^1/_{100}$ $^1/_{1000}$ bezeichnen die Verdünnung des Kalbsmuskelsaftes.
Verdünnung durch SGAW-Medium.
Ablesung nach 20 Std.
Inokulat ca. 100,000 Keime / ccm.

freien Kontrollröhrchen noch überall das gleiche intensive Wachstum stattfand. Aus Abb. 5 geht hervor, daß entweder keine p-Aminobenzoesäurezugabe in verdünntem Kalbsmuskelsaft das gleiche Wachstum wie in unverdünntem Preßsaft entstehen läßt, oder erst in Konzentrationen, die chemisch nachweisbar sind.

Weiterhin war zu untersuchen, ob Zugaben von p-Aminobenzoesäure zum SGAW-Medium Bewachsungstypen hervorzubringen vermögen, die den Bewachsungstypen der Organmedien gleichen. Abb. 6 zeigt, daß p-Aminobenzoesäurezugaben in beliebiger Konzentration innerhalb eines relativ engen Konzentrationsbereichs der Sulfonamide einen plötzlichen Uebergang von vollständiger Inhibition zur Wirkungslosigkeit bewirken. Demgegenüber zeigen die Organmedien – vor allem in den höheren Cibazolkonzentrationen – eine ganz allmählich fallende Inhibitionswirkung. Es ist also nach den Versuchen im inhibitorarmen Medium wenig wahrscheinlich, daß p-Aminobenzoesäure allein – z. B. durch Autolyse freigesetzt – die aufgezeigten Inhibitionstypen hervorzubringen vermag.

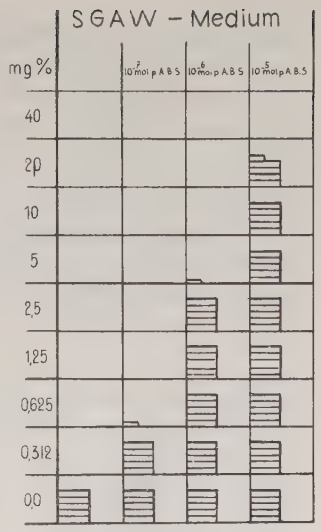


Abb. 6.
Ablesung nach 24 Std.
Inokulat
ca. 100,000 Keime / ccm.

Gegen diese Möglichkeit spricht aber vor allen Dingen folgendes: Gibt man zu inhibitorarmen Körpermedien oder zu synthetischen Medien p-Aminobenzoesäure in Konzentrationen von 10^{-6} und weniger, so erfolgt bei 10^{-6} eine deutliche Steigerung der Cibazolinhibition, die schon bei 10^{-7} M nur noch unbedeutend ist. Aber auch in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} M finden wir nicht die starke Inhibition, wie sie etwa der Ultrafiltratrückstand aus Kalbs- und Kaninchenmuskel oder das gealterte Ultrafiltrat des Kalbsmuskels zeigen. *Da aber in diesen Körpermedien keine p-Aminobenzoesäure nachzuweisen ist, muß ihre Konzentration weniger als 10^{-6} betragen, kann also für die Wachstumsversuche mit E. coli nicht den starken antagonistischen Effekt der erwähnten Medien allein erklären.* Selbst wenn man annehmen wollte, daß durch Autolyse ständig etwas in das Eiweißmolekül eingebaute p-Aminobenzoesäure frei würde, so kann dadurch der Inhibitionseffekt der Körpermedien nicht erklärt werden, weil die allenfalls entstehende p-Aminobenzoesäure-Konzentration viel zu gering ist. Es könnte sich höchstens um viel wirksamere p-Aminobenzoesäureverbindungen handeln.

Stehen bei der Besprechung der Unterschiede vor allem die Medienfraktionen im Vordergrund, so weisen daneben auch die aufgezeigten Unter-

schiede zwischen den einzelnen Medien verschiedener Herkunft auf qualitative und quantitative Unterschiede im Inhibitorengehalt hin.

B. Versuche zur weiteren physikalisch-chemischen Charakterisierung der Inhibitionsfaktoren

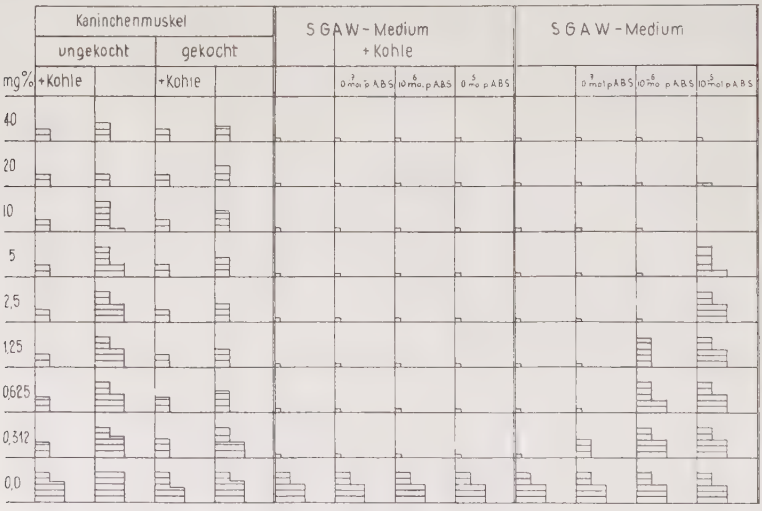
Eine sichere Methode, um p-Aminobenzoesäure aus einer Lösung zu entfernen, bildet die Adsorption an Kohle. Eine Lösung von 10^{-2} Mol p-Aminobenzoesäure wird durch Zugabe von 10% Kohle (eisenfreies Norit) frei von chemisch nachweisbarer p-Aminobenzoesäure. Schüttelt man SGAW-Me-

Abb. 7.

Zugabe von p-Aminobenzoesäure zu synthetischem Medium (SGAW-Medium). Vergleich mit durch Sieden und Kohlezugabe fraktioniertem Kaninchenmuskelmedium. Kontrolle der Kohlewirkung in mit p-Aminobenzoesäure versetztem SGAW-Medium.

Fraktionierung des Kaninchenmuskelsaftes: 1. *Kochen* (1 Std. in siedendem Wasserbad). Der gekochte Saft wurde zur Hälfte mit 10% Norit versetzt, 30 Min. bei 40 Grad gehalten und dann die Kohle abfiltriert. Die andere Hälfte wurde unverändert belassen. 2. *Inaktivieren* (1 Std. bei 60 Grad im Wasserbad). Das Versetzen mit Kohle erfolgte gleich wie bei der gekochten Fraktion. Alle 4 Unterfraktionen wurden durch Kerzen sterilfiltriert.

In gleicher Weise wie das Kaninchenmuskelmedium wurde auch das SGAW-Medium mit Kohle behandelt.



Ablesung nach 15 Std.

Inokulat ca. 250,000 Keime / ccm. Das große Inokulat erlaubt nach wenigen Teilungen schon eine ganz leichte Opaleszenz der Medien, deshalb liegt hier der «Nullwert» bei einer leichten Opaleszenz, was in der Tabelle durch ein kleines Trübungszeichen wiedergegeben ist. (Die bakteriostatische Aktion äußert sich bekanntlich vorerst in einer Verlängerung der Teilungsdauer und führt erst nach einigen Teilungen zur wirklichen Stase.)

dium, dem p-Aminobenzoesäure zugesetzt worden ist, mit Kohle, so wird es, wie Abb. 7 zeigt, frei von biologisch nachweisbarer p-Aminobenzoesäure. Ebenso ist mit p-Aminobenzoesäure versetztes Blutserum nach Schütteln mit Kohle frei von chemisch nachweisbarer p-Aminobenzoesäure. Bleibt also nach Schütteln mit Kohle in einem Organmedium noch eine Inhibitionswirkung erhalten, so ist diese kaum der freien p-Aminobenzoesäure zuzuschreiben.

Zur Ausführung eines entsprechenden Versuches mit Organmedium verwendeten wir ein vier Wochen altes Ultrafiltrat von Kalbsmuskel. Es hatte sich bei der Prüfung stark an Inhibitoren angereichert erwiesen, trotzdem keine diazotierbaren Körper nachweisbar waren. Dieses Ultrafiltrat wurde mit Kohle geschüttelt und zeigte nachher, wie aus Abb. 8 hervorgeht, noch deutliche Inhibitionswirkung.

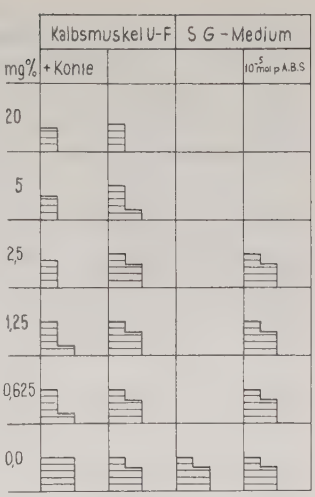


Abb. 8.
Ablesung nach 24 Std.
Inokulat
ca. 100,000 Keime / ccm.

Eine weitere Abklärung der «Inhibitornatur» kann man erzielen, indem man sowohl gekochte als auch ungekochte Organmedien untersucht. Handelt es sich bei den Inhibitorstoffen wesentlich um p-Aminobenzoesäure, so müssen sie den Kriterien dieses Körpers entsprechen, d. h. sie müssen thermostabil und sehr gut adsorbierbar sein. Der in Abb. 7 wiedergegebene Versuch läßt folgende Zusammenfassung zu:

1. In der gekochten wie auch in der ungekochten Fraktion ist die nicht adsorbierbare Inhibition sehr wahrscheinlich nicht auf p-Aminobenzoesäure zurückzuführen.

2. In der thermolabilen Fraktion ist der sehr starke Anteil der adsorbierbaren Inhibitionsfraktoren nicht auf p-Aminobenzoesäure in freier oder adsorbierter Form zurückzuführen, denn diese müßte beim Kochen in Lösung bleiben, da die freie, experimentell zugefügte p-Aminobenzoesäure bei der Präzipitation der Eiweiße nicht mitgerissen wird.

3. Lediglich für den thermostabilen, adsorbierbaren Teil der Inhibition kann auf Grund dieses Versuches eine allfällige Wirkung der freien p-Aminobenzoesäure nicht ausgeschlossen werden.

Die im vorhergehenden Kapitel aufgeworfenen Fragen lassen sich nun dahin beantworten: Es kann ein einziger «Inhibitor» weder in verschiedener Quantität noch in verschiedener Form die erhobenen Befunde erklären.

In bezug auf die Rolle der Form gilt diese Folgerung nur insofern, als immer der gleiche Inhibitor letztendlich freigesetzt angenommen wird. Die Möglichkeit der Entstehung einer viel wirksameren Kombinationsverbindung ist dabei offengelassen.

Eine solche wirksamere Kombinationsverbindung ist von *Auhagen* (1) in der p-Aminobenzoyl-1-glutaminsäure gefunden worden.

Eine überwiegende Rolle der p-Aminobenzoesäure unter den körpereigenen Inhibitoren in freisetzbarer oder freier Form ist mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Zur Sicherung der obigen Folgerungen würde der Ausschluß der Möglichkeit beitragen, daß Adsorptionsverhältnisse der p-Aminobenzoesäure oder des Cibazols die Resultate wesentlich beeinflussen können. Wenn nämlich die freie oder durch hydrolytische Prozesse frei werdende p-Aminobenzoesäure auf Grund eines Verdrängungsmechanismus gegenüber Sulfonamiden wirksam sein sollte, so müßten die quantitativen Bindungsverhältnisse der beiden im Wettstreit liegenden Stoffe an die in Frage kommenden Substrate eine Erklärung dafür liefern, daß eine außerordentlich geringe p-Aminobenzoesäure-Konzentration, wie sie allenfalls in vivo und in Körpermedien vorkommen könnte, den für die bakteriostatische Wirkung notwendigen, hohen Sulfonamidspiegel erfordert. Das könnte hervorgerufen werden dadurch, daß entweder die p-Aminobenzoesäure eine viel größere Affinität zu den Bakterien hat als das Sulfathiazol, oder daß das Sulfathiazol stärker als die p-Aminobenzoesäure an andere Faktoren gebunden wird, vor allem an die Kolloide der Körpermedien.

Zur Abklärung der Bindung von p-Aminobenzoesäure resp. von Sulfathiazol an die kolloide Fraktion der Körpermedien bedienten wir uns der Ultrafiltration von Körpermedien, welche p-Aminobenzoesäure resp. Cibazol enthielten, wobei wir sie vorgängig der Ultrafiltration 45 Min. auf Körpertemperatur brachten. (Die im Serum fehlende Fibrinogenfraktion bindet die Sulfonamide nach den Ergebnissen des Kataphoreseverfahrens nicht in nennenswertem Ausmaße [18], so daß ihr Fehlen nicht ins Gewicht fällt.) Bei der Ultrafiltration von Rinderserum, das 21 mg% Cibazol enthielt, ergab sich im Ultrafiltrat eine Konzentration von 8 mg%, währenddem sich der Ultrafiltratrückstand auf 28 mg% anreicherte. Der entsprechende Versuch mit p-Aminobenzoesäure ergab gleiche Konzentration im Ultrafiltrat und Ultrafiltratrückstand. In Organpreßsäften wird die p-Aminobenzoesäure ebenfalls nicht gebunden, die Bindung des Cibazols ist hier bedeutend geringer als im Serum[2]). Aus den Versuchen geht hervor, daß das Sulfathiazol stärker an die kolloide Fraktion gebunden wird als die p-Aminobenzoesäure, daß diese Bindung aber keineswegs total ist. Es ist nach den erhaltenen Resultaten etwa $^1/_5$ des Cibazols im Serum und $^3/_4$ in Organpreßsäften als frei anzusehen. *B. D. Davies* hat festgestellt, daß bei einer Plasmakonzentration von 10 mg% etwa 25% des Sulfathiazols frei vorhanden sind. Nimmt man an, daß p-Aminobenzoesäure gar nicht adsorbiert wird, Sulfathiazol dagegen etwa

[2]) Allerdings gilt dies nicht absolut für die Bindungsverhältnisse der Organe in vivo, da unsere Preßsäfte zur Stabilisierung inaktiviert sind.

zu 80%, so wären durch diese Adsorptionskräfte Unterschiede in der notwendigen Konzentration beider Stoffe von 5 : 1 erklärlich.

Durch die Untersuchungen über die Adsorption der p-Aminobenzoesäure an die Kolloide der Körpermedien ist der Einwand widerlegt, daß bei der Ultrafiltration freie p-Aminobenzoesäure in der kolloiden Fraktion zurückgehalten werden kann.

Daß eine scheinbare Wirkungsminderung des Sulfathiazols auf Grund von Adsorption in Betracht kommt, ließ sich dadurch nachweisen, daß bei Züchtung von E. coli in gleichzeitiger Gegenwart eines Adsorbens (Kohle) und Sulfathiazol das Bakterienwachstum bei absolut hemmenden Konzentrationen von Sulfathiazol möglich ist. Also darf angenommen werden, daß ein Teil der Inhibition der kolloidalen Fraktion durch Adsorption bedingt sein kann. Diese Möglichkeit ist vor allem für die Inhibitionswirkung des Serums bedeutsam, währenddem sie für die Organpreßsäfte kaum von wesentlicher Bedeutung sein dürfte.

Ein Maß für die Bindungstendenz der Bakterien gegenüber p-Aminobenzoesäure resp. Cibazol schien die Auswaschbarkeit dieser Verbindungen aus den Bakterien. Dabei wurden gewaschene, in Ringer suspendierte Kolibazillen und Staphylokokken mit gleichprozentigen p-Aminobenzoesäure- resp. Cibazollösungen versetzt, 12 Std. bei 37 Grad geschüttelt und nach wiederholten Waschungen der Gehalt der Bakteriensuspension bestimmt. Die genauen Angaben sind aus dem Versuchsprotokoll Tab. 3 ersichtlich. Die Bindungstendenzen von Sulfathiazol resp. p-Aminobenzoesäure sind nach diesem Versuch, geprüft an E. coli und Staphylokokken, von der gleichen Größenordnung. Die im Versuchsresultat wiedergegebenen Unterschiede liegen durchaus innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode. Will man trotzdem die Unterschiede als relevant ansehen, so ist ein geringer Unterschied der Bindungstendenz zuungunsten des Cibazols herauszulesen. Dieser Unterschied ist aber niemals so groß, um das auf Grund der Adsorption des Cibazols an die Kolloide errechnete Verhältnis von 5 : 1 über 10 : 1 hinaus zu vergrößern.

Ultrafiltration und Dialyse entsprechender Bakteriensuspensionen wurden ebenfalls durchgeführt. Sie lassen infolge technischer Schwierigkeiten nur grobe Unterschiede in den Bindungstendenzen erkennen. Auch aus diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß keine ausgesprochenen Unterschiede der Bindungstendenzen dieser beiden Stoffe gegenüber E. coli – mindestens zum Bakterium als Ganzem – festzustellen sind.

Das Ergebnis der physikalisch-chemischen Untersuchungen und der Bewachsungsversuche führt zu folgenden Ueberlegungen: Es steht fest, daß in inhibitorreichen Körpermedien der Beginn der bakteriostatischen Wirkung des Cibazols bei etwa 2,5–10 mg%, d. h. bei 10^{-4} bzw. 4×10^{-4} Mol liegt. Auf Grund der Bindungsversuche an die Kolloide einerseits und die Bakterien andererseits ergibt sich weiterhin, daß zu einer Verdrängung auf Grund der Bindungstendenzen die p-Aminobenzoesäure in mindestens 1/10 der Cibazolkonzentration vorhanden sein muß. Ist p-Aminobenzoesäure allein für die beobachtete Inhibition verantwortlich, so müßte sie damit in einer Konzen-

Tabelle 3

Auswaschbarkeit des Sulfathiazols resp. der p-Aminobenzoesäure aus der in Ruhe befindlichen Bakterien-Suspension, geprüft an E. coli und Staphylokokken.

3 Bouillonkolben à 500 ccm, beimpft mit E. coli, werden zentrifugiert und die Bakterien nach Waschen in 8 ccm Ringer aufgenommen.

2 ccm dieser sehr dichten Suspension werden zum Trocknen und nachheriger Gewichtsbestimmung in den Exsikkator verbracht.

3 ccm Suspension werden mit 22 ccm einer 50 mg% Sulfathiazol-Ringerlösung verdünnt und 12 Stunden im Brutschrank geschüttelt.

3 ccm werden in der gleichen Weise mit 22 ccm einer 50 mg% p-Aminobenzoesäure-Ringerlösung geschüttelt.

Nach 14 Std. wird folgendermaßen vorgegangen: Die p-Aminobenzoesäure- resp. Sulfathiazolsuspensionen werden zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf ihren Gehalt an den zugefügten Stoffen geprüft (A).

Das Zentrifugat wird 6mal mit 7,5 ccm Ringerlösung gewaschen und der Gehalt jedes Waschwassers bestimmt (B-G).

Zum Schluß wird der Rückstand in 7,5 ccm 20% Trichloressigsäure 30 Min. bei 70 Grad gehalten und darauf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit bestimmt. Diese Fraktion ist als Bakteriengehalt in der Tabelle wiedergegeben (H).

Ganz gleich wird mit den Suspensionen von Staphylokokken vorgegangen.

	E. coli						Staphylokokken					
	p-ABS			Sulfathiazol			p-ABS			Sulfathiazol		
	ccm	mg%	= mg ABS	ccm	mg%	= mg ST	ccm	mg%	= mg ABS	ccm	mg%	= mg ST
Ausgangswerte	25	46	11,5	25	46	11,5	25	46	11,5	25	46	11,5
A. Suspensionsflüssigkeit	23	45	10,35	23	41	9,43	23	45	10,35	23	45	10,35
B. 1. Waschung	7½	7	0,53	7½	12	0,9	7½	8	0,6	7½	11	0,83
C. 2. Waschung	7½	2	0,15	7½	2	0,15	7½	3½	0,26	7½	3	0,23
D. 3. Waschung	7½	1	0,08	7½	3	0,23	7½	1	0,08	7½	2	0,26
E. 4. Waschung	7½	Spuren	ca. 0,02	7½	?*	ca. 0,05	7½	Spuren	ca. 0,02	7½	1	0,08
F. 5. Waschung	7½	0	0,0	7½	Spuren	ca. 0,02	7½	0	0,0	7½	Spuren	ca. 0,02
G. 6. Waschung	7½	0	0,0	7½	0	0,0	7½	0	0,0	7½	0	0,0
H. Bakteriengehalt	7½	0,6	0,05	7½	0,4	0,03	7½	0,5	0,04	7½	0,3	0,02
Trockengewicht in g	0,086			0,086			0,136			0,136		
mg% pro Bakterientrockengewicht	50			30			30			15		
Summe des in den Analysen gefundenen ST resp. der p-ABS in mg	11,18			10,81			11,35			11,79		

* = zerbrochen p-ABS = p-Aminobenzoesäure ST = Sulfathiazol

tration von 10^{-5} Mol oder darüber vorhanden sein. Damit wäre sie sicher im Bereiche der chemischen Nachweisbarkeit, was aber nach unseren Befunden nicht der Fall ist. Die Versuche sprechen dafür, daß die volle antagonistische Wirkung von p-Aminobenzoesäure gegenüber Cibazol in bezug auf die untersuchten Bakterien erst bei Konzentrationsverhältnissen möglich wird, die zwischen 10 : 1 und 1 : 1 liegen.

Dieses Resultat stimmt gut mit einigen biologischen Beobachtungen überein. Verfolgt man nämlich das Bakterienwachstum in den Körpermedien in seiner zeitlichen Entwicklung und nicht nur nach terminaler Trübung, so treten feinere Wachstumsunterschiede zutage. Es stellt sich dabei heraus, daß zur vollen Kompensation, d. h. gleiches Wachstum mit und ohne Sulfathiazoleinwirkung, ein molekulares Verhältnis von p-Aminobenzoesäure zu Sulfathiazol wie 1 : 1 notwendig ist. Diese Zahlen decken sich vollständig mit denen von *Hirsch* (13). Die in vivo notwendigen Blutkonzentrationen an p-Aminobenzoesäure, die es braucht, um den Sulfonamideffekt aufzuheben, sind ebenfalls sehr groß. *Meier* und *Allemann* (27) brauchten eine höhere Blutkonzentration von p-Aminobenzoesäure als von Sulfathiazol, um den Heileffekt von Sulfathiazol aufzuheben.

Die Ergebnisse der physikalisch-chemischen Versuche lassen sich dahin zusammenfassen, daß die in vivo und in Körpermedien möglicherweise vorhandene p-Aminobenzoesäure-Konzentration die vorhandene Inhibition auf Grund von Adsorptions- oder Bindungsgleichgewichtsverschiebungen von p-Aminobenzoesäure und Sulfathiazol nicht zu erklären vermag.

Zusammenfassende Schlußfolgerungen

1. Antagonistische Beeinflussung des Bakterienwachstums kann sowohl durch chemisch ähnlich strukturierte als auch durch chemisch ganz verschieden gebaute Antagonisten zustande kommen.

2. Für die Wirkungstheorie der Sulfonamide ist vor allem ein Antagonismus als besonders wichtig bezeichnet worden: derjenige gegenüber p-Aminobenzoesäure (*Woods*, *Fildes*, *Wagner-Jauregg*).

3. In Körpermedien, d. h. möglichst unveränderten Organpreßsäften, ist nach den in dieser Arbeit erhobenen Befunden eine antagonistische Wirkung vorhanden. – Diese kann nicht auf einen einzigen «Antagonisten» in verschiedener Form oder Menge zurückgeführt werden.

4. Insbesondere sprechen folgende Versuchsergebnisse gegen eine hauptsächliche oder alleinige Rolle der freien p-Aminobenzoesäure in Körpermedien:

a) Das Ultrafiltrat der Körpermedien zeigt wesentlich geringeren Antagonisteneffekt als der Ultrafiltratrückstand. Dies spricht gegen kristalloid gelöste Stoffe wie die p-Aminobenzoesäure als Ursache.

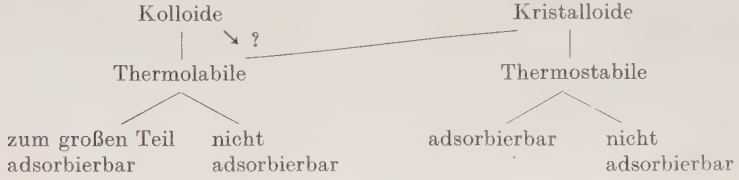
b) Zugabe von p-Aminobenzoesäure zu verdünnten Körpermedien läßt nicht den Inhibitionstypus der unverdünnten Körpermedien entstehen. Aehnliche Inhibition kann nur durch wesentlich höhere, chemisch nachweis-

bare p-Aminobenzoesäurekonzentrationen erreicht werden. Diese hohen Konzentrationen können aber in Organpreßsäften nicht nachgewiesen werden.

c) Zugabe von p-Aminobenzoesäure zu synthetischen Medien gibt einen anderen Inhibitionstypus in Abhängigkeit von der Konzentration als der in den verschiedenen Körpermedien vorliegende.

d) Die verschiedene Bindung der freien p-Aminobenzoesäure resp. des Sulfathiazols an Bakterien einerseits und die Körperkolloide andererseits kann nicht allein erklären, daß die in vivo und in Körpermedien vorhandene Inhibition der Sulfathiazolwirkung auf Grund von Adsorptions- oder Bindungsgleichgewichtsverschiebungen zwischen p-Aminobenzoesäure und Sulfathiazol zustande kommt, trotzdem ihr eine gewisse Bedeutung zukommt.

e) Die in Körpermedien nachweisbaren antagonistischen Faktoren lassen sich etwa nach folgendem Schema zusammenstellen:



Die dargelegten Versuche zeigen, daß es sich bei dem Sulfonamidantagonismus der Körpermedien, der auf Grund von bakterienexogenen d. h. aus dem Medium stammenden Stoffen erfolgt, nicht hauptsächlich um freie p-Aminobenzoesäure handeln kann, sondern daß neben physikalisch-chemischen Gleichgewichtsverhältnissen eine Reihe anderer ihrer Art nach differenter chemischer Faktoren von Bedeutung ist.

1. *Auhagen, E.:* Hoppe-Seylers Z. **277,** 197 (1943). – 2. *Auhagen, E.:* Hoppe-Seylers Z. **274,** 48 (1942). – 2a. *Bloch, H., Erlenmayer, H.:* Helv. chim. Acta **25,** 694 (1942). – 3. *Davies, B. D.:* Science **95,** 78 (1942). – 4. *Dorfmann, A., Rice, L., Koser, S. A.,* und *Saunders, F.:* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **45,** 750 (1940). – 5. *Fildes, P.:* Lancet, May 25th, **1940.** – 5a. *Fildes, P.:* Bioch. J. **32,** 1600 (1938). – 6. *Fox, Ch. L.,* und *Rose, H. M.:* Science **95,** 412 (1942). – 7. *Fox, Ch. L.* und *Rose, H. M.:* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **50,** 142 (1942). – 8. *Gärtner, K.:* Zbl. Bakter. usw. **150,** 97 (1943). – 9. *Haas:* Z. Immunit.forsch. **101,** 183 (1942) (zitiert nach *Gärtner*). – 10. *Harris, J. S.,* und *Kohn, H. I.:* J. Pharmacol. exper. Med. **73,** 343 (1941). – 11. *Harris, J. S.,* und *Kohn, H. I.:* J. Pharmacol. exper. Med. **73,** 383 (1941). – 12. *Harris, J. S.,* und *Kohn, H. I.:* J. biol. Chem. **141,** 989 (1941). – 13. *Hirsch, J.:* C. r. ann. arch. soc. turque de Sciences phys. nat. Fasc. 10, **1941–1942.** – 14. *Illényi, A.:* Biochem. Z. **311,** 24 (1941–1942). – 15. *Jensen, K. A., Schmith, K.,* und *Brandt, P.:* Klin. Wschr. **47,** 1042 (1942). – 16. *Johnson:* Science **95,** 104 (1942) (zitiert nach *Martin*). – 16a. *Iványics, G.:* Hoppe-Seylers Z. **276,** 33 (1942). – 17. *Kimmig, J.:* Klin. Wschr. **22,** 31 (1943). – 18. *Kimmig, J.,* und *Weselmann, H.:* Arch. Derm. (Am.) **182,** 436 (1942). – 19. *King, J. T.,* und *Kaplan,*

M. S.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **50,** 41 (1942). – 20. *Loomis, T. A.:* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **47,** 159 (1941). – 21. *Markees, S.:* Schweiz. med. Wschr. **50,** 1479 (1943). – 22. *Martin, G. J.:* J. biol. Chem. **144,** 289 (1942). – 23. *McIlwain, H.:* Brit. J. exper. Path. **22,** 148 (1941). – 24. *McIlwain, H.:* Biochem. J. **36,** VI (1942). – 25. *McIlwain, H.:* Biochem. J. **36,** 417 (1942). – 26. *MacLoed, L. M.:* J. exper. Med. (Am.) **72,** 217 (1940). – 27. *Meier, R.,* und *Allemann, O.:* Unveröffentlichte Versuche. – 28. *Meier, R.:* Helv. med. Acta **10,** 147 (1943). – 29. *Mellon, R. R., Locke, A. P.,* und *Shinn, L. E.:* Amer. J. med. Sci., June **1940,** 749. – 30. *Miller, J. K.:* J. Pharmacol. (Am.) **72,** 354 (1941). – 31. *Möller, C. F.:* Vit. u. Hormone **2,** 198 (1942). – 32. *Nester, E.:* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **42,** 668 (1939). – 33. *Rammelkamp, C. H.:* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **45,** 169 (1940). – 34. *Schubert, H.:* Zbl. Bakter. usw. I. Orig. **148,** 399 (1942) (zitiert nach *Gärtner*). – 35. *Strauß, E.,* und *Finland, M.:* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **47,** 428 (1941). – 36. *Wagner-Jauregg, Th.:* Naturw. **31,** 335 (1943). – 37. *Wallersteiner, W. K. S.:* Nature **151,** 586 (1943). – 38. *West, R.,* und *Coburn, A. F.:* J. exper. Med. (Am.) **72,** 91 (1940). – 39. *White, H. J.:* J. Bacter. (Am.) **38,** 549 (1939). – 40. *Woods, D. D.:* Brit. J. exper. Path. **21,** 74 (1940).

Curriculum vitae

Ich wurde am 5. Mai 1917 geboren als Sohn von Max Allgöwer, Kaufmann, und Anna Allgöwer geb. Enderlin. Primarschule und Realgymnasium besuchte ich in St. Gallen. Dann begann ich mein Studium in Genf, bestand dort die beiden propädeutischen Examen, hielt mich ein Semester in Zürich auf und wandte mich für den Rest meines Studiums nach Basel, wo ich im November 1942 mit dem Staatsexamen abschloß. Seit Abschluß der Aspirantenschule arbeite ich in den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba bei Prof. Dr. Rolf Meier.